

HÁSKÓLI ÍSLANDS

Raunvísindadeild

Líffræðiskor



HÁSKÓLI ÍSLANDS

# Hagamúsinn (*Apodemus sylvaticus*) sem líkan til rannsókna á genaflæði milli lands og eyja

eftir

Bryndísi Stefánsdóttir

BS-ritgerð

Umsjón: Dr. Ástríður Pálsdóttir

Reykjavík

Maí 2003

## **Yfirlýsing höfundar**

Hér með lýsi ég því yfir að ritgerð þessi er byggð á mínum eigin athugunum, er samin af mér og að hún hefur hvorki að hluta til né í heild verið lögð fram áður til hærri prófgráðu.

---

Bryndís Stefánsdóttir

## **Ágrip á íslensku**

Þróun er afleiðing breytinga í erfðaefninu hjá ákveðnum hópi af einstaklingum. Erfðafræðilegur breytileiki mótast af náttúrulegu vali, stökkbreytingum, genaflæði og hendingu. Þessir þættir geta valdið því að landfræðilega einangraðir stofnar og æxlunarsamfélög sömu tegundar breytast og fjarlægast hvert annað í erfðasamsetningu og verða síðar aðskildar tegundir.

Einangrun stofna eins og á eyjum getur haft miklar afleiðingar fyrir þéttleika og genamengi stofna. Stofnar á eyjum sýna oft svipuð líffræðileg einkenni. Þetta kallast eyjaheilkenni.

Hagamúsin er mjög gott líkan til að skoða genaflæði milli lands og eyja. Það er mjög áhugavert að kanna erfðabreytileika hagamúsa á Breiðafirði því að slíkar upplýsingar geta gefið fyrstu hugmyndir um samskipti hagamúsastofna í Breiðafirði.

Ætlunin með þessari rannsókn sem ég hóf var að kanna hvort hagamúsastofn tveggja eyja á Breiðafirði væri erfðafræðilega frábrugðinn stofnum á meginlandinu sitt hvorum megin Breiðafjarðar og fá fyrstu hugmyndir um samskipti hagamúsastofna á því svæði. Þar sem ég lenti í ýmsum tæknilegum vandamálum tókst mér ekki að ljúka þessari rannsókn á tilsettum tíma og mun það koma í hlut einhvers annars að ljúka henni.

## **Ágrip á ensku**

Evolution is the result of progressive changes in the genetic composition of a population. Genetic variation is the product of natural selection, mutations, geneflow and genetic drift. As result, geographically isolated populations of a species may change and diverge in genetic structure and become distinct species.

Geographical isolation, e.g. on islands, can affect population density and genetic structure. Island species often exhibit similarities in biological characteristics. This is known as the island syndrome.

The field mouse is a good model for studying geneflow between islands and mainland. A study on the genetic variation between field mice on islands in the Bay of Breidafjordur may thus give valuable information on movements of field mice in that area.

The purpose of the study was to check if two populations of field mice on two islands in Breidafjörður are genetically distinct from two mainland populations and gather some information on gene flow. This study could not be completed due to various technical problems and it will thus be left to someone else to finish this research at a later stage.

## **Þakkir**

Ég vil þakka öllum sem lögðu mér lið við þetta verkefni, þá sérstaklega Ástríði Pálsdóttir á Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði á Keldum, Menju von Schmalensee og Róberti Stefánssyni á Náttúrustofu Vesturlands, Viktori Mar Bonilla á Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum, Páli Hersteinssyni prófessor í spendýrafræði við Háskóla Íslands og Einari Árnasyni prófessor í þróunarfræði við Háskóla Íslands. Einnig þakka ég Margréti Ösp Stefánsdóttir og hennar hjálparmönnum fyrir að útvega sýni til verkefnisins.

## Efnisyfirlit

<b>Yfirlýsing höfundar</b> .....	<b>i</b>
<b>Ágrip á íslensku</b> .....	<b>ii</b>
<b>Ágrip á ensku</b> .....	<b>ii</b>
<b>Þakkir</b> .....	<b>iv</b>
<b>1 Inngangur</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Fræðilegur bakgrunnur</b> .....	<b>1</b>
<b>2.1 Erfðabreytileiki</b> .....	<b>1</b>
2.1.1 Náttúrulegt val.....	2
2.1.2 Stökkbreytingar.....	2
2.1.3 Genafldaði.....	3
2.1.4 Hending.....	4
2.1.5 Landnemaáhrif.....	5
<b>2.2 Stofnar</b> .....	<b>5</b>
2.2.1 Einkenni eyjastofna.....	6
<b>2.3 Einkenni og uppbygging örtungla</b> .....	<b>6</b>
<b>2.4 Rannsóknir á erfðabreytileika</b> .....	<b>8</b>
2.4.1 DNA fjölföldun (PCR).....	11
2.4.2 Tölfræðigreining.....	13
<b>3 Hagamús sem líkan</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 Stofnar og uppruni hagamúsa</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2 Almennt um hagamúsina</b> .....	<b>17</b>
<b>4 Rannsókn</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1 Markmið</b> .....	<b>17</b>
<b>4.2 Aðferðir</b> .....	<b>18</b>
4.2.1 Sýnataka.....	18
4.2.2 DNA einangrun.....	19
4.2.3 Rafdráttur.....	20
4.2.4 DNA fjölföldun (PCR).....	20
4.2.5 Örgreining.....	22
<b>4.3 Niðurstöður</b> .....	<b>23</b>
<b>5 Lokaorð</b> .....	<b>24</b>
<b>6 Heimildaskrá</b> .....	<b>25</b>

## **1 Inngangur**

Í þessari ritgerð ætla ég að gera grein fyrir áhrifum einangrunar á erfðabreytileika, erfðafjarlægð og genaflæði hagamúsastofna í Breiðafirði. Ég byrja á því að fjalla um fræðilegan bakgrunn og tala um erfðabreytileika, orsök hans og afleiðingu, þá fjalla ég um stofna og sérstaklega einkenni eyjastofna. Í lok fyrsta kaflans mun ég tala um þær aðferðir og greiningar sem notaðar eru mikið um þessar mundir til að meta ofangreinda þætti. Í næsta kafla fjalla ég um hagamúsina, m.a. uppruna hennar, hegðun og lífsvenjur. Í fjórða kaflanum segi ég frá rannsókn sem ég gerði en tókst ekki að ljúka vegna tæknilegra vandamála sem gerðu það að verkum að rannsóknin dróst út fyrir þann tímaramma sem áætlað var í upphafi. Ég mun greina frá þeim aðferðum sem ég notaði og kynna þessa rannsókn þó að niðurstöður liggi ekki fyrir.

## **2 Fræðilegur bakgrunnur**

### ***2.1 Erfðabreytileiki***

Þróun er afleiðing breytinga í erfðaefninu hjá ákveðnum hópi einstaklinga. Með skilgreiningu á mun milli slíkra hópa má varpa ákveðnu ljósi á þróun (Hartl & Clark 1989).

Samræmi er milli tengsla einstaklinga og erfðafræðilegs munar á þeim. Þessi munur er í einhverju hlutfalli við breytingar á erfðaefninu í tíma (Hartl & Clark 1989).

Erfðafræðilegur breytileiki mótast af náttúrulegu vali, stökkbreytingum, genaflæði og hendingu. Þessir þættir geta valdið því að landfræðilega einangraðir stofnar og æxlunarsamfélög sömu tegundar breytast og fjarlægast hvert annað í erfðasamsetningu og verða síðar aðskildar tegundir. Í flestum tilfellum er hægt að ákvarða skiptingu stofna með því að nota góðar mælingar á erfðafjarlægð milli þeirra. Búast má við að landfræðilega aðskildir stofnar sýni meiri erfðafjarlægð vegna lítills genaflæðis. Þetta er þekkt sem hugtakið "einangrun vegna fjarlægðar" (Sing & Rhomberg 1987).

Soulé (1973, tilvitn. í Gaines o.fl. 1997) skilgreindi 6 þætti sem eru þess valdandi að erfðabreytileiki getur minnkað í einangruðum stofnum eins og t.d. eyjastofnum. Í fyrsta lagi eykst innæxlun þegar einstaklingar verða einangraðir frá

öðrum stofnum. Í öðru lagi minnkar genaflæði til einangraðra stofna. Í þriðja lagi leiða landnemaáhrif og flöskuhálsar til hendingar. Í fjórða lagi minnkar virk stofnstærð ( $N_e$ ) vegna innæxlunar og minna genaflæðis. Í fimmta lagi leiðir einsleitara vistkerfi til minni erfðafjölbreytileika því í fjölbreytilegu vistkerfi er ekki eins mikið um sérhæfingar og í einsleitu vistkerfi. Með sérhæfingu geta ákveðnar arfgerðir horfið með tímanum. Að lokum minnkar erfðabreytileiki vegna náttúrulegs vals á einangruðum svæðum (Soulé 1973, tilvitn. í Gaines o.fl. 1997).

### **2.1.1 Náttúrulegt val**

Náttúrulegt val verkar á breytileika. Allar lífverur hafa umframæxlunargetu miðað við það sem þarf til að viðhalda tegundinni en þegar til lengri tíma er litið gefur hver einstaklingur að meðaltali af sér einn einstakling eða þar tvo einstaklinga þegar stofnstærð er stöðug. Þannig deyja flestir afkomendur áður en þeir ná að fjölga sér. Val þýðir að þeir lifa af sem eru á einhvern hátt betur aðlagðir umhverfinu en aðrir. Þar sem gen lífverunnar stýra að mestum hluta eiginleikum hennar og byggingu, í samspili við umhverfið og tilviljanir í þroskun, er ein arfgerð oft valin fram yfir aðrar. Náttúrulegt val verkar þannig á þann breytileika sem fyrir er í stofninum. Náttúrulegt val eyðir oftast breytileika því langflestar stökkbreytingar eru óhagkvæmar eða banvænar. Ef stökkbreyting verður sem eykur hæfni einstaklingsins umfram aðra í stofninum ætti hún að verða allsráðandi með tímanum. Jafnvægi getur í einhverjum tilfellum myndast milli neikvæðs náttúrulegs vals og myndunarhraða samsættunnar (Futuyma 1997).

### **2.1.2 Stökkbreytingar**

Stökkbreytingar eru helsti uppruni erfðabreytileika. Nýjar samsættur geta aðeins myndast ef einhverjar breytingar verða á erfðaeftinu (Hartl 1981). Stökkbreytingar geta verið punktbreytingar, fasabreytingar eða flutningur á litningahlutum (Futuyma 1997):

Punktbreyting er þegar einn basi kemur í stað annars. Þetta breytir aðeins þeim tákna sem basinn tilheyrir og því aðeins einni amínósýru. Ef breytingin verður á þriðja basa í tákna eru um 70 % líkur á því að stökkbreytingin verðir þögul, þ.e. amínósýran



breytist ekki. Minni líkur eru á þöglum stökkbreytingum á hinum tveimur sætunum. Punktbreyping getur valdið því að stoppmerki myndast og styttest þá fjölpeptíðkeðjan.

Fasabreytingar er þegar basar, einn eða fleiri, bætast inn í genið eða detta úr því. Ef fjöldi basa sem detta út eða koma inn er ekki margfeldi af þremur breytast allir tákna fyrir aftan breypinguna og þar af leiðandi allar amínósýrurnar. Fjölpeptíðkeðjan verður því allt önnur. Þessar breypingar eru oft mjög alvarlegar fyrir lífveruna og hverfa í flestum tilfellum.

Litningabreytingar geta falist í umhverfu, þ.e. að röð basa snýst við, hluti litnings fellur burt eða bætist við. Litningar geta einnig tvöfaldast, runnið saman eða klofnað (Futuyma 1997).

### **2.1.3 Genafhlæði**

Genafhlæði gerist við far eða flutning gena milli stofna. Genafhlæði getur hindrað að tegund þróist í aðskildar tegundir vegna hendingar eða náttúrulegs vals. Oft er talað um að genafhlæði sé hamlandi kraftur í þóun (Hartl & Clark 1989). Ef genafhlæði er mikið, þ.e. margir einstaklingar ferðast milli stofna, verða stofnarnir á endanum með sömu samsætur í sömu tíðninni og að lokum verður þetta einn og sami stofninn. Það má því segja að genafhlæði hamli gegn aðgreiningu stofna innan tegunda (Hartl 1981).

Genafhlæði minnkar innæxlun, eins og Wright (1951, tilvitn. í Ciofi & Bruford 1999) bendir á. Þá gæti hagstæð aðlögun átt sér stað þannig að tegundir sem skiptast upp í stofna, að hluta til vegna lítils genafhlæðis, eiga meiri möguleika á aðlögun. Margar tegundir hafa aðlaganir sem minnka hættuna á innæxlun. Þær leiðir sem tegundir hafa til að forðast innæxlun eru nokkrar: Í fyrsta lagi fara ung dýr af öðru hvoru kyninu í burtu frá fæðingarstað sínum til að forðast innæxlun með foreldri eða systkini. Í öðru lagi skipta fullorðin karldýr um aðsetur til að forðast föður-dóttur innæxlun. Í þriðja lagi er líkleggra að ung kvendýr fari á lóðafar þegar faðirinn er fjarverandi heldur en ef hann er heima. Í fjórða lagi, þegar fullorðið karldýr er heima þá forðast náskylt kvendýr á lóðarfari það og leitar frekar að öðru karldýri til að æxlast við (Foltz & Hoogland 1983). Innæxlun er samt algengari hjá litlum stofnum en stórum. Ætla má að minna genafhlæði sé meðal stofna á eyjum vegna einangrunar. Þar verður því

meiri innæxlun og þar af leiðandi tilhneiging til að missa erfðafjölbreytileika (Frankham 1997, tilvitn. í Cöte o.fl. 2002).

#### **2.1.4 Hending**

Hending er talin vera mjög mikilvægur þáttur í þróunarsögu tegunda og margar kenningar hafa komið fram þar sem hending leikur stórt hlutverk. Meðal þeirra kenninga er hlutleysiskenning sameindaþróunar (Kimura 1968, tilvitn. í Hartl 1981).

Samkvæmt kenningunni hafa sumar stökkbreytingar ekki áhrif á hæfni lífverunnar. Tíðni slíkra samsætna er því ekki ákveðin af kröftum eins og náttúrulegu vali heldur af og genaflæði og hendingu (Hartl 1981).

Hending er ferli sem felur í sér tilviljanakenndan flutning samsætna frá einni kynslóð til annarar. Við þennan flutning verður aðeins brot af mögulegum okfrumum fullþroska einstaklingar.

Suzuki o.fl. (1989) útskýra þetta mjög vel: Ef við skoðum stofn sem inniheldur 1000 einstaklinga með tíðni "a" 0,5 í einni kynslóð þá getur tíðnin í næstu kynslóð verið t.d. 0,493 eða 0,0505 vegna breytinga á fjölda afkvæma með þessa ákveðnu arfgerð. Þetta getur svo gerst kynslóð eftir kynslóð. Ef við reiknum með að engin öfl séu til staðar til að ýta þessu til baka í upphaflega tíðni þ.e. engir valkraftar á borð við náttúrulegt val, stökkbreytingar eða genaflæði, má búast við að á endanum detti "a" út eða verði allsráðandi þ.e.  $P=0$  eða  $P=1$ . Eftir þetta er ljóst að stofninn er orðinn arfhreinn um þessa samsætu (Suzuki o.fl. 1989).

Samkvæmt hlutleysiskenningunni er því mikill hluti erfðafræðilegrar fjölbreytni vegna hlutlausra (m.t.t. náttúrulegs vals) samsætna, en jafnvægi er milli þess að hlutlausar samsætur hverfi vegna hendingar og ný myndist vegna stökkbreytinga (Hartl & Clark 1989).

Hending hefur miklu meiri áhrif á litla stofna en stóra. Innæxlun er algengari hjá einangruðum stofnum en hjá þeim sem hafa meiri samskipti við aðra stofna. Þetta veldur því að áhrif hendingar eru meiri og á endanum missir stofninn erfðabreytileika. Minni erfðabreytileika er því oft að finna á eyjum (Cöte o.fl. 2002).

### **2.1.5 Landnemaáhrif**

Landnemaáhrif verða þegar lítill hópur aðskilst frá stærri stofni og myndar nýjan stofn. Nýi stofninn mun hafa frábrugðna tíðni arfgerða frá upprunalega stofninum. Þegar nokkrir einstaklingar einangrast frá öðrum einstaklingum stofnsins verður þeirra eigin arfgerð undirstaða arfgerðar nýja stofnsins. Nýir stofnar sem verða til vegna landnemaáhrifa hafa öðru vísi þróunarmöguleika en upprunalegi stofninn. Það er vegna þess að kraftar náttúrulegs vals móta mismunandi stofna á mismunandi vegu, oft vegna mismunandi umhverfis.

Landnemastofnar eru vanalega mjög litlir. Þess vegna geta breytingar þar verið frekar hraðar og þessir stofnar geta aðlagast miklu fyrr en stærri stofnar (Hedrick 1985). Landnemaáhrif auka líkurnar á útdauða því með því að tapa erfðabreytileika er stofninn búinn að tapa möguleika á að geta svarað mismunandi umhverfisbreytingum, þ.e. umhverfisbreyting getur orðið sem stofninn getur ekki aðlagast (Hedrick o.fl 2001; Whittaker 1998).

## **2.2 Stofnar**

Orðið stofn á yfirleitt ekki við alla tegundina; það á frekar við um hóp einstaklinga af sömu tegund sem lifa innan sama landfræðilega einangraða svæðis, þar sem einstaklingarnir geta æxlast hver við annan þ.e.a.s. þeir eru æxlunarlega einangraðir frá öðrum einstaklingum sömu tegundar. Virk stofnstærð ( $N_e$ ) er oftast minni en raunveruleg stofnstærð. Erfitt getur verið að meta hvort hópur einstaklinga sé í raun og veru aðskilinn stofn eða ekki (Hartl 1981).

Sýnt hefur verið fram á að líflandafræðilegar breytur eins og stærð eyja, fjarlægð milli eyja og fjarlægð frá meginlandi og einnig sérstakar tegundabreytur á borð við stökkbreytingar og genaflæði, geta haft mikil áhrif á líffræði stofna á eyjum (Hochberg o.fl. 2001). Minnkun á stofnstærð, eða flöskuhálsar, eru taldir draga úr erfðafjölbreytileika (Wright 1931, tilvitn. í Tarr o.fl. 1998).

Fækkun á fjölda samsæta og fjölbreytilegra genasæta hefur meiri áhrif á stofna sem hafa minnkað heldur en þá sem ekki hafa minnkað (Nei o.fl. 1975, tilvitn. í Tarr o.fl. 1998; Maruyama & Fuerst 1985, tilvitn. í Tarr o.fl. 1998).

### **2.2.1 Einkenni eyjastofna**

Einangrun stofna eða hindrun innflutnings inn í stofna getur haft miklar afleiðingar fyrir þéttleika og genamengi stofna. Stofnar á eyjum sýna oft svipuð líffræðileg sérkenni, þetta kallast "island syndrome" eða eyjaheilkenni. Skoðum nánar hvað einkennir eyjastofna (Hochberg & Möller 2001):

Í fyrsta lagi virðast eyjastofnar hafa minni erfðafræðilegan fjölbreytileika en stofnar á meginlandinu. Það eru a.m.k tveir þættir sem stuðla að þessu: (1) Eyjastofnar eru afkomendur fárra innflytjenda og (2) eyjastofnar eru tiltölulega litlir miðað við stofna á meginlandinu (Frankham 1997).

Í öðru lagi eru stofnar á eyjum venjulega staðbundnir þ.e. far minnkar þegar einstaklingar af nýrri tegund flytjast á eyju.

Í þriðja lagi hafa eyjur oft fábreyttari gróður- og dýralíf. Möguleg ástæða fyrir þessu er lítil innflutningur nýrra einstaklinga eða genaflæði.

Í fjórða lagi er þéttleiki oft meiri á eyjum en á meginlandinu. Talið er að ástæðan geti að hluta til verið minni samkeppni og afrán á eyjum.

Í fimmta lagi eru eyjastofnar frábrugðnir í stærð, eiga gjarnan frábrugðna lífsögu eins og meiri lífslíkur, meiri frjósemi og einstaklingarnir þroskast hægar (Hochberg & Möller 2001). Það er því greinilegt, eins og áður sagði, að hinar ýmsu breytur hafa mikil áhrif á líffræði stofna á eyjum.

### **2.3 Einkenni og uppbygging örtungla**

Örtungl eða „simple sequence repeats” (SSRs) eru endurtekningar sem finnast dreifðar um genamengi allra dreif- og heilkjörnunga sem skoðaðir hafa verið til þessa. Þessi svæði finnast bæði í tjáðum svæðum sem ótjáðum svæðum, en þó meira í ótjáðum og einkennast þau af miklum breytileika í lengd (Zane o.fl. 2002). Vegna þessa mikla fjölbreytileika og vegna þess að þau eru jafnríkjandi hafa þessi svæði verið notuð sem erfðamörk. Beckmann og Weber (1992, tilvitn. í Hancock 1999) sýndu að CA/TG endurtekningar, sem eru algengastar tvínúkleotíða endurtekninga, eru tvisvar sinnum algengari en AT endurtekningar og þrisvar sinnum algengari en AG/TC endurtekningar. Genamengi annara spendýra virðast innihalda svipað hlutfall þessara endurtekninga (Hancock 1999).

Menn greinir á um hve langar þessar endurtekningar mega vera til að þær séu skilgreindar sem örtungl. Armour o.fl. (1999) skilgreina örtungl sem 2-8 basapara (bp) endurtekningar en aðrir eins og Goldstein og Pollock (1997) tala um 1-6 bp eða jafnvel er talað um 1-5 bp (Schlötterer 1998). Yfirleitt er talað um að örtungl sé 10-50 föld 1-10 basa endurtekningar (Hancock 1999). Þó að menn greini á um lengd þessara endurtekninga er ljóst að örtungl eru mjög mikilvægt fjölnota verkfæri sameindalíffræðinga.

Örtungl hafa verið mikilvæg verkfæri í kortlagningu genamengja en notkun þeirra spannar þó vítt svið allt frá DNA rannsóknum í fornleifafræði og sakamállum til stofnerfðafræðirannsókna (Zane o.fl. 2002). Vegna notagildis þessara erfðamarka hefur verið mikil aukning í notkun þeirra á seinustu árum og margar af birtum greinum vitna til notkunnar örtungla. Það hefur því orðið mikil aukning á fjölda þeirra lífvera sem hafa þekkt örtungl.

Aðalókosturinn við örtungl er hve erfitt er að finna þessi svæði í upphafi. Þau þarf að einangra frá grunni úr flestum tegundum lífvera. Þetta er vegna þeirrar staðreyndar að örtungl finnast vanalega á ótjádum svæðum þar sem tíðni kirkis innsetningar er hærri en í tjádum svæðum. Örtunglasvæði eru því mjög mismunandi milli tegunda (Beaumont & Bruford 1999).

Hraði stökkbreytinga hjá örtunglum er mjög mikill miðað við hraða punkt stökkbreytinga sem eru  $10^{-9}$  til  $10^{-10}$  atvik/genasæti/eftirmyndun. Fjöldi stökkbreytinga *E.coli* í tilraunaglassi er talin vera  $10^{-2}$  atvik/genasæti/eftirmyndun (Levinson & Gutman 1987 í Hancock 1999) en rannsóknir á músum hafa sýnt að hraðinn er um  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  atvik/genasæti/eftirmyndun (Dallas 1992, tilvitn. í Hancock 1999).

Menn hafa deilt um uppruna og tilgang þessara fjölbreytilegu svæða. Talið er að í staðinn fyrir að hafa eitthvert líffræðilegt hlutverk virðist vera líklegra að þessi svæði hafi myndast og viðhaldist vegna DNA "stömunar" (slippage) þegar eftirmyndun á sér stað (Levinson & Gutman 1987, tilvitn. í Hancock 1999). Þessi tilgáta felur í sér að polymerasinn virðist "stama" á endurteknum röðum DNA (Schloetterer & Trautz 1992, tilvitn. í Hancock 1999). Stömun í eftirmyndun getur átt sér stað þegar nýi DNA strendingurinn aðskilst frá sniðmáts (template) strendingnum. Þegar óendurteknar raðir eru eftirmyndaðar skapast ekki þetta vandamál því aðeins er ein leið fyrir nýmyndaðan strending að para sig aftur við sniðmáts strendinginn, en ef endurteknar raðir eru til

staðar getur nýmyndaði strendingurinn misparast við sniðmáts strendinginn. Þegar eftirmyndun heldur áfram eftir svona misþögn verður nýmyndaði strendingurinn lengri eða styttri en sniðmáts strendingurinn.

Menn hafa einnig bent á það að endurröðun geti myndað þennan fjölbreytileika í lengd á tvennan hátt; með ójöfnum skörunum (crossing over) og með genaturnun (gene conversion) (Hancock 1999). Ójöfn skörun felur í sér skörun milli litningaþræða sem passa ekki hvor við annan. Þetta gerist mjög auðveldlega í löngum tví-endurteknum röðum þar sem endurröðunarkerfið getur ekki auðveldlega greint rétta samröðun milli strendinganna tveggja. Þetta gefur því möguleika á úrfellingu í einni DNA sameind og innsetningu í hinni DNA sameindinni sem leiðir til jöfnunar hjá þessum endurteknu röðum (Hancock 1999). Genaturnun, sem felur í sér einstefnu (unidirectional) flutning á upplýsingum með endurröðun, væntanlega til að lagfæra einhverja skemmd, getur flutt raðir í og úr fasa frá einni samsætu til annarar (Hancock 1999).

#### **2.4 Rannsóknir á erfðabreytileika**

Til að geta borið saman mismunandi samsætur og mismunandi stofna er nauðsynlegt að hafa þægilega aðferð til að mæla erfðabreytileika (Hartl 1981).

Sex grundvallaraðferðir hafa verið notaðar til að rannsaka hvaða samsætur eru til staðar á ákveðnum genasætum þegar verið er að mæla erfðabreytileika.

- 1) Prótein rafdráttur, sem er í raun óbein nálgun þar sem yfirleitt er verið að skoða *allozymes*, þ.e. ensím sem eru mismunandi vegna þess að samsæturnar á bak við þau eru mismunandi.
- 2) Skerðiensímagreining (Restriction Fragment Length Polymorphism, eða RFLP). Hér er DNA klippt niður af skerðiensími með ákveðnu þekktu skerðiseti (t.d. *HpaI*) og síðan rafdreigið.
- 3) Tilviljunakennd DNA fjölföldun (Random Amplification of Polymorphic DNA, eða RAPD). Tilviljunakenndar DNA raðir eru magnaðar upp með PCR og síðan rafdreagnar.
- 4) Örtungla (microsatellite/Simple Sequence Repeat (SSR)) breytileiki. Hér er verið að skoða bandastærð ákveðins þekkts genasætis með því að gera PCR með sérhönnuðum vísam (primers) fyrir þetta tiltekna genasæti og rafdraga síðan.

Breytileika á milli einstaklinga í bandastærð á þessu genasæti endurspeglar mismunandi samsætu.

- 5) Mögnuð skerðiensímagreining (Amplified Fragment Length Polymorphisms, eða AFLP). Hér er DNA klippt niður af tveim mismunandi skerðiensímum t.d MseI og EcoRI. Þrjár gerðir af skerðibútum koma úr þessu: einn með EcoRI skurð á báðum endum, einn með EcoRI skurð á einum enda en MseI skurð á hinum endanum og svo einn bút með MseI skurð á báðum endum. Síðan eru svokallaðar millistykkjaraðir (adapter) sem eru sértækar fyrir annan hvorn skurðinn látnar tengjast við skurðina. Þetta er svo magnað upp og rafdreigið. Helsti munurinn á AFLP og RFLP er að við RFLP eru skerðiensímabúturnir ekki magnaðir upp með PCR, og þar er verið að skoða fáa og stóra búta. Við AFLP eru hins vegar yfirleitt skoðaðir 50-100 skerðibútar fyrir hvern einstakling.
- 6) DNA raðgreining. Við raðgreiningu er ákveðið gen eða DNA bútur magnaður upp með PCR hvarfi með sérhæfðum vísnum sem framleiða fjöldan allan af bútum með eins basa mun að lengd. Við rafdrátt eru búturnir aðskildir þannig að hægt er að lesa basaröðina. Kjarnsýruröð einstaklinga er síðan borin saman (Schlöttere 1998).

Þegar velja á hvaða nálgun á að nota þarf að hafa í huga úr hvaða lífveru sýnið kemur. Í sumum tilfellum reynist mjög erfitt og jafnvel ómögulegt að finna ákveðin erfðamörk. Einnig þarf að meta magn sýnis því mjög mismunandi er hvaða nálganir henta hverju magni t.d. krefst RFLP tiltölulega mikils magns sýnis en RAPD og AFLP aðferðirnar þurfa tiltölulega lítið magn af sýni. Ekki síst þarf að hafa í huga kostnað og þann tíma sem nálganirnar taka (Beaumont & Bruford 1999).

Erfðabreytileika er hægt að mæla með því að skoða samsætutíðni (allele frequency). Tíðni ákveðinnar samsætu í hópi einstaklinga er einfaldlega hlutfall þeirrar samsætu af öllum samsætum sem finnast á tilteknu genasæti. Fjölbreytilegt genasæti er genasæti þar sem algengasta samsætan hefur minni tíðni en 0,95 (Hartl 1981).

Örtungl eru mikið notuð til að meta erfðabreytileika nú á dögum. Vegna þess að örtungl eru mjög fjölbreytileg að lengd eru þau ákjósanlegt verkfæri til að einkenna einstaklinga á sameindaerfðafræðilegum grunni.

Til að geta skilgreint breytileika á erfðafræðilegum grunni verðum við að hafa slíkt verkfæri. Örtungl veita okkur upplýsingar um arfgerðir þeirra tilteknu genasæta

sem skoðuð eru. Síðan DNA fjölföldun (polymerase chain reaction, PCR) kom til sögunnar (Saiki 1985, tilvitn. í Birt & Baker 2000) hefur notkun örtungla verið mjög útbreidd í líffræði. PCR gengur út á að magna upp ákveðin svæði í genamenginu sem eru mörkuð af vísnum sem eru stuttar einpátta DNA raðir.

Nú á dögum nýta margar rannsóknir þessi jafnríkjandi, fjölbreytilegu erfðamörk til að rannsaka erfðauppbyggingu stofna (Chambers & MacAvoy 2000). Þekking á mismunandi erfðabreytileika milli stofna getur veitt mikilvægar upplýsingar, m.a. í þróunarfræði, vistfræði og við verndun tegunda (Balloux & Lugon-Moulin 2002). Hraði breytinga í mismunandi erfðamörkum er mjög mismunandi vegna mismunandi gangs grundvallar ferla eins og endurröðunar, stökkbreytinga og vals. Þegar bera á saman aðskilnað fjarskyldra tegunda eða stofna er hentugt að nota hvatbera DNA því hvatbera DNA þróast mun hægar en DNA í kjarna. Það er líka mjög hentugt til að rekja ættir einstaklinga. Örtungl eru erfðamörk á DNA í kjarna og eru fyrst og fremst notuð á einstaklingsgrunni og við stofnathuganir. Örtungl eru hentug til að skoða aðgreiningu stofna eða tegunda sem gerst hafa nýlega á þróunarfræðilegum tímakvarða því breytingahraði þeirra er miklu meiri en hjá öðrum erfðamörkum (Sunnucks 2000).

Yu o.fl. (2002) rannsökuðu aðgreiningu stofna og genaflæði húsamúsa (*Mus musculus castaneus*) í Taiwan með því að skoða sex örtungla DNA erfðamörk. Þeir báru saman sjö stofna, þ.á.m. einn frá Fukien Province (Jin-men) í suðaustuhluta Kína, sem aðskilið er frá Taiwan með Taiwansundi. Í ljós kom að heildarfjölbreytileiki (polymorphic level) sex genasæta var mikill ( $h=0,76$ ) þrátt fyrir að einstakir stofnar hafi haft mismikla arfblendni ( $h=0,35-0,83$ ). Fyrir stofna á Taiwan var engin sönnun fyrir því að "einangrun vegna fjarlægðar" og magn genaflæðis væri ekki tengt landfræðilegri fjarlægð. Genafleði var meira yfir Taiwansund en innan Taiwan. Þessar athuganir er ekki hægt að skilja nema í samhengi við landnám mannsins og útpenslu landbúnaðar á svæðinu. Einnig kom í ljós að minni aðgreining (differentiation) var milli Jin-men stofnsins og stofnanna sex á Taiwan heldur en milli þessara sex stofna á Taiwan. Stofn Jin-men virtist vera mjög svipaður og stofnar á vestanverðri Taiwan. Þetta sýnir eins og áður sagði að genaflæði yfir Taiwansund er greinilega mikið. Sá stofn sem var ólíkastur hinum stofnunum var eini stofninn sem tekinn var austan megin á eyjunni og er genaflæði milli austur- og suðurhluta eyjunnar því minna en milli Taiwan og meginlandsins.



Cote o.fl. (2002) skoðuðu 14 örtungla genasæti til að athuga hvort hending minnki erfðabreytileika í hreindýrum frá Svalbarða í samanburði við stofna frá meginlandinu. Meginlandsstofnar hreindýra stunda árstíðabundið far sem getur numið þúsundum kílómetra. Slík ferðalög virðast minnka áhrif hendingar á meðan stofnar á eyjum eru kyrrsettir vegna einangrunar og þar hefur hending meiri áhrif.

Einnig skoðuðu þeir hvort aðgreining stofna væri til staðar milli tveggja svæða á Nordenskiöldland á Svalbarða. Þessi tvö svæði, Colesdalen/Reindalen og Sassendalen, einkennast af víðum U-laga dölum sem eru umluktir jöklum og 600-1000 m háum fjöllum.

Í ljós kom að þessir tveir eyjastofnar sem skoðaðir voru innihéldu miklu minni fjölbreytileika í örtunglasvæðunum en tveir meginlandastofnar sem þeir miðuðu við. Þetta kemur heim og saman við það sem Frankham (1997) hélt fram, þ.e. að fjölbreytileiki eyjastofna væri minni en meginlandsstofna, líklega vegna hendingar.

Einnig kom í ljós að stofnarnir á Svalbarða eru frábrugðnir í genasamsetningu (genetic composition) þrátt fyrir að vera minna en 50 km frá hvor öðrum,  $F_{ST}=0,034$ . Þetta kom þeim á óvart því ekki eru miklar landfræðilegar hindranir milli svæðanna tveggja og því ætti genaflæði að eiga sér stað óhindrað. Þrátt fyrir það gátu þeir ekki komist að annari niðurstöðu en að genaflæði milli þessara svæða væri hindrað af einhverri óþekktri ástæðu.

#### **2.4.1 DNA fjölföldun (PCR)**

Mikil bylting varð í stofnerfðafræði, erfðavistfræði og fleiri greinum þegar PCR tæknin kom til sögunnar. Þessi tækni gerir rannsóknarmönnum kleift að magna upp ákveðna DNA búta í tilraunaglas í ótakmarkað magn. (Saiki o.fl 1985, tilvitn. í Birt & Baker 2000).

Í stuttu máli fer þetta fram á þann hátt að DNA svæðið sem magna á upp er ákveðið af vísnum sem setjast á sitt hvorn enda bútsins sem fjölfalda skal. Hver hringur byrjar á því að hvarfblandan er hituð það mikið að DNA-ið eðlissviptist og DNA strendingarnir aðskiljast ( $94-95^{\circ}\text{C}$ ). Hitinn er svo lækkaður til að vísarnir geti bundist við viðeigandi raðir á sniðmáts strendingnum ( $45-60^{\circ}\text{C}$ ) og markað það svæði sem magna á upp. Mjög mikilvægt er að þetta hitastig sé rétt því ef hitastigið er of lágt getur

binding (annealing) orðið á öðrum stöðum en óskað er eftir, þ.e. ósérhæfð binding. Ef hitastigið er of hátt verður einfaldlega engin binding. Að lokum er hitinn stilltur á það hitastig sem polymerasinn vinnur best við (70-72°C) og þessi ákveðni bútur magnast upp. Fjöldi DNA sameinda vex með veldisvexti því að eftir hvern hring getur nýi strendingurinn orðið sniðmát fyrir einhvern annan. Gerðir eru um 20-30 slíkir hringir (Birt & Baker 2000).

DNA polymerasinn sem er notaður er einangraður úr hitakærri bakteríu og þolir því þann hita sem þarf til að eðlissvipta DNA-ið. Almenn er mest notaða ensímið í dag Taq polymerasi sem einangraður er úr bakteríunni *Thermus aquaticus* (Birt & Baker 2000).

Vísarnir ráða mestu um hvort PCR heppnast eða ekki. Þeir eru vanalega um 20-24 basa pör (bp) að lengd. Stundum er hægt að nota vísa hannaða fyrir aðrar tegundir en oftast þarf þó að sérhanna vísa fyrir hverja tegund. Rannsóknarmaður getur aldrei fullvissað sig um að vísarnir virki þó að hann fylgi nákvæmum reglum, sumir vísar ganga einfaldlega ekki af óþekktri ástæðu (Birt & Baker 2000).

Styrkur dNTP kirna og MgCl<sub>2</sub> hefur einnig mikil áhrif. Styrkur dNTP er oftast á bilinu 20-200 µmol fyrir hvern basa. Hærri styrk er hægt að nota en of lágur styrkur þýðir að polymerasinn hefur ekki nóg efni til að búa til nýjan strending svo að mögnun verður ekki eins mikil. Þetta getur því verið takmarkandi þáttur (Birt & Baker 2000).

MgCl<sub>2</sub> styrkur er einnig mjög mikilvægur því polymerasinn vinnur aðeins við réttan styrk af MgCl<sub>2</sub>. Það er enginn einn ákveðinn styrkur sem hentar öllum en oftast gefur 2 mmol fullnægjandi niðurstöður. MgCl<sub>2</sub> styrkur er sérstaklega mikilvægur þegar magna á upp örtungla genasæti því rangur styrkur getur valdið því að polymerasinn fer að "stama" á endurtekningunum og bakgrunnstruflanir verða miklar (Birt & Baker 2000).

Einn stór kostur við PCR er að geta fundið breytileika í DNA röð án þess að þurfa að raðgreina, því raðgreining getur verið dýr og tímafrek. PCR er mjög mikilvægt hvarf til að skoða örtungl. Hægt er að magna upp ákveðin örtungla genasæti og skoða fjölbreytileika innan þess genasætis milli einstaklinga. Merkja verður annaðhvort dNTP eða endamerkja vísana með flúrmerkingu eða geislavirkni svo hægt sé að skoða þennan fjölbreytileika (Chambers & MacAvoy 2000). Stærð á mögnuðum örtunglasvæðum er svo hægt að ákvarða með rafdrætti.

Margþætt PCR (multiplex PCR) gefur kost á greiningu tveggja eða fleiri genasæta samtímis. Þessi gerð af PCR tækni er notuð þegar æskilegt er að magna upp margar genasæta afurðir í einu hvarfi, sem bæði sparar tíma og peninga. Þessi tækni krefst mjög mikillar stöðlunar því að mörg vísapör í sömu hvarfefnablöndunni auka líkur á ósérhæfðri bindingu sem truflar mögnun á ákveðnum svæðum (Tettelin o.fl. 1999). Vísapörin eru oft lituð með mismunandi flúrmerkingum eða með sama lit en þá þarf að passa að búturnir skarist ekki í lengd. Ekki er ráðlegt að leggja í margþætt PCR nema hvert vísapar fyrir sig gangi vel.

#### **2.4.2 Tölfræðigreining**

Tölfræðilíkon eru mikilvæg tæki í stofnerfðafræði. Þau byggjast á tilgátum sem tilgreina sérstök stærðfræðileg sambönd milli mælibreytna í kerfinu. Stærðfræðileg líkon eru alltaf einfaldari en hinar raunverulegu aðstæður. Mörgum þáttum kerfisins er einfaldlega sleppt til að líkanið verði ekki of flókið. Gott líkan tekur með alla mikilvægu þættina en sleppir þeim sem minna máli skipta (Hartl 1981).

Ein aðferð til að meta erfðabreytileika er að reikna út arfgerðabreytileika (haplotype diversity), þ.e líkur á því að tveir einstaklingar, valdir af handahófi, séu af mismunandi arfgerð (Nei & Tajima 1981). Þessi aðferð tekur bæði mið af fjölda og tíðni arfgerða. Eftirfarandi jafna er notuð:

$$h = (1 - \sum x^2) / n$$

Þar sem  $h$  er tíðni arfgerðabreytileika og er á bilinu 0-1 þar sem 0 er engin arfblendni en 1 er fullkomin arfblendni,  $x$  er tíðni hvernar arfgerðar og  $n$  er heildarfjöldi einstaklinga.

Í flestum tilfellum er hægt að ákvarða skiptingu stofna með því að nota góðar mælingar á erfðafjarlægð milli stofna. Aðgreining stofna hefur í för með sér, eins og áður sagði, að áhrif innæxlunar koma fram og hægt er að mæla þessi áhrif með því að skoða minnkun á arfblendnum arfgerðum því aukin innæxlun eykur tíðni arfhreinna einstaklinga (Hartl og Clark 1989).

Til eru nokkrar mælingar á erfðafjarlægð og flestar tengjast þær  $F_{ST}$  á einn eða annan hátt. Þegar búið er að velja mæliaðferðina er fjarlægð milli allra mögulegra stofnpara reiknuð. Fyrir  $n$  stofna eru  $n(n-1)/2$  þess konar pör. Þá eru tveir stofnar með minnstu fjarlægð sameinaðir og meðhöndlaðir sem einn stofn, en síðan er

erfðafjarlægðin milli þessa nýja stofns og allra hinna reiknuð. Þetta ferli er endurtekið þangað til tveir slíkir stofnar eru eftir (Hartl & Clark 1989).

Athugum nánar stærðina  $F_{ST}$  sem flestar mælinganna byggjast á.

Skyldleikastuðullinn  $F_{ST}$  mælir aðgreiningu undirstofna innan tegunda.  $F_{ST}$  gildi sem eru frá 0-0,05 tákna litla aðgreiningu, 0,05-0,15 tákna miðlungs aðgreiningu, 0,15-0,25 mikla aðgreiningu og öll gildi yfir 0,25 tákna að mjög mikil aðgreining undirstofna er innan tegundarinnar.  $F_{ST}$  mælir minnkun á arfblendni í undirstofni vegna hendingar, þannig að:

$$F_{ST} = H_T - H_S/H_T$$

Þar sem

$H_S$  = Væntanleg arfblendni einstaklinga þar sem einstaklingar æxlast tilviljanakennt í undirstofni.

$H_T$  = Væntanleg arfblendni einstaklinga þar sem einstaklingar æxlast tilviljunarkennt í heildarstofninum.

Ein algengasta leiðin til að mæla erfðafjarlægð sem byggist á  $F_{ST}$  er  $D$  (genafjarlægð) gildi Nei (1975 í Hartl & Clark 1989). Þessi aðferð tekur mið af tíðni arfgerða í stofnunum. Grunnurinn að þessum mælingum er svokallað staðlað samræmi (normalized identity), sem lýsir líkum á að tvö gen, tekin tilviljunarkennt úr tveimur stofnum, séu eins.  $D=0$  þýðir engin erfðafjarlægð milli stofna. Það eru engin efri mörk á  $D$ -inu (Hartl & Clark 1989).  $J_{XY}$  eru líkurnar á því að tvö gen, tekin tilviljunarkennt úr tveimur stofnum ( $X$  og  $Y$ ), séu eins. Það gefur þá augaleið að  $J_{XX} = \sum p_i^2$  þar sem með handahófskenndri pörun,  $J_{XX}$  er arfhreinindi í stofni  $X$ , og  $J_{YY}$  er arfhreinindi í stofni  $Y$ , þ.a.  $J_{YY} = \sum q_i^2$ . Þá getum við sagt að  $J_{XY} = \sum p_i q_i$  (Hartl & Clark 1989).

Skilgreining á stöðluðu samræmi (normalized identity),  $I$  fyrir þessi gen er:

$$I = J_{XY} / \sqrt{J_{XX} J_{YY}}$$

Og þá genafjarlægðin,  $D$ , er

$$D = -\ln(I) \text{ eða } D = -\log_e I$$

Það er ótrúlegt hve lítið genaflæði þarf til að koma í veg fyrir mikla aðgreiningu á stofnum vegna hendingar. Genafleði er hægt að mæla út frá jöfnunni

$$F_{ST} = 1/(1+4N_e m)$$

þar sem  $N_e m$  er fjöldi flakkara (migrant) á kynslóð,  $N_e$  er virk stofnstærð og  $m$  er far tíðni (migration rate). Þegar fjöldi flakkara eykst minnkar  $F_{ST}$  eða aðgreining stofna. Þegar  $N_e m = 0$ , engin flakkari þá er  $F_{ST} = 1$ . Fyrir  $N_e m = 0,25$  þýðir það einn flakkari fjórðu hverju kynslóð og  $F_{ST} = 0,5$ . Þegar  $N_e m = 2$  þýðir það að tveir flakkarar eru í hverri kynslóð og  $F_{ST} = 0,11$  o.s.frv. (Hartl 1981).

### 3 Hagamús sem líkan

Líkan er einföldun á flóknum aðstæðum þar sem smáatriðum er sleppt til þess að geta beint athyglinni að mikilvægum atriðum. Í stofnerfðafræði snúast líkón um þætti á borð við stofnstærð, æxlunarmynstur, landfræðilega dreifingu einstaklinga, stökkbreytingar, genaflæði og



1. mynd: Hagamús (*Apodemus sylvaticus*)  
(ljósmynd: Róbert Stefánsson)

náttúrulegt val. Þó að við vildum gjarnan skilja sameinuð áhrif þessara og fleiri þátta eru víxlverkanir þeirra svo flóknar að erfitt er að skoða allt í einu. Einfaldar aðstæður þar sem rannsakaðir eru nokkrir þættir í einu eru því ákjósanlegastar (Hartl 1981).

Hagamúsinn (1. mynd) er mjög gott líkan til að skoða genaflæði milli lands og eyja. Hagamúsinn er lítil og flýgur ekki, þ.e. kemst bara landleiðina, hefur samfellda útbreiðslu nema á eyjum og hefur líklega verið lengi einangruð á sumum eyjum.

Það er mjög áhugavert að kanna erfðabreytileika hagamúsa á Breiðafirði því að slíkar upplýsingar geta gefið fyrstu hugmyndir um samskipti hagamúsastofna í Breiðafirði. Forvitnilegt er að skoða hvaðan eyjastofnarnir eru upprunnir, t.d. hvort þeir eru skyldari innbyrðis en stofnum af meginlandinu. Eru þeir ef til vill svipaðir stofnum á meginlandinu, væntanlega vegna mikils genaflæðis? Hagamús hafa fundist í sumum eyjum en öðrum ekki. Ætla má að þær hafi flust með mönnum til eyja sem eru fjarri meginlandinu og genaflæði gæti hafa verið töluvert við þær aðstæður. Annars staðar er

mögulegt að mýs hafi komist af sjálfsdáðum út í eyjar á fjöru eða með ís og þá fer genaflæði væntanlega eftir fjarlægð milli lands og eyja.

### 3.1 Stofnar og uppruni hagamúsa

Hagamúsin er í ættinni Muridae, en sú ætt samanstendur af fjölda ættkvísla og tegunda. Aðeins fjórar tegundanna hafa fundist á Íslandi: Hagamús, húsamús (*Mus musculus*), brúnrotta (*Rattus norvegicus*) og svartrotta (*Rattus rattus*).

Hagamúsin er upprunnin í Evrópu og Mið-Asíu, í tempraða beltinu. Ekki er talið að hagamúsin hafi getað borist með landbrúm hingað til lands því að þá ætti að finnast svipuð afbrigði af *Apodemus sylvaticus* í Færeyjum, en svo er ekki. Hagamúsin er því talin hafa komið hingað til lands frá Skandinavíu og jafnvel Bretlandseyjum með landnámsmönnum fyrir um 1100 árum síðan (Karl Skírnisson 1993).

Íslenska hagamúsin er flokkuð sem sérstök deilitegund (*Apodemus sylvaticus grandiculus*) því hún er útlitslega frábrugðin öðrum hagamúsum er meðal stæstu hagamúsa (Degerböl 1939).

Hagamús er ein þeirra spendýrategunda sem hafa vítt útbreiðslusvæði og geta þrífist í fjölbreytilegu umhverfi. Hérlandis lifir hagamúsin væntanlega á nyrstu mörkum útbreiðslusvæðis síns, sem dæma má af því að útbreiðsla tegundarinnar í Noregi nær nyrst til Þrændalaga. Suðurmörk útbreiðslusvæðis hagamúsar nær frá NV-Afríku og með norðanverðri strönd Miðjarðarhafsins til Ísrael og Persaflóa. Austurmörk hennar eru við Himalajafjallgarðinn. Í norðri nær hún hvorki til norðurhluta Rússlands né Finnlands en finnst í Suður-Svíþjóð og sunnan Þrándheims í Noregi. Hagamús dafna á Bretlandseyjum og á Íslandi en hvorki í Færeyjum né á Grænlandi (Karl Skírnisson 1993).

Hagamúsin lifir í gróðurlendi um allt land, einnig í hraunum, urðum og oft í nábýli við menn. Hagamús er einnig að finna á ýmsum eyjum við landið, svo sem Svefneyjum, Hvallátrum og minni eyjum á Breiðafirði, í Vigur í Ísafjarðajúpi og Flatey á Skjálfanda. Hins vegar eru hagamús hvorki í Flatey og Skáleyjum á Breiðafirði, né í Æðey í Ísafjarðardjúpi, Hrísey, Grímsey, Skrúði, Papey eða Viðey (Karl Skírnisson 1993).

### 3.2 Almenn um hagamúsina

Fullorðnar hagamús eru oftast grá- eða gulbrúnar á baki en hvítgráar á kviði og eru skýr skil þar á milli (Karl Skírnisson 1993). Lengd fullorðinnar músar frá tryni að halarót er 8 - 10,5 cm en halinn er svo til jafnlangur búk og haus. Fullvaxnir hagamúsarsteggir vege um 26-30 g en kvendýr 24-31 g. Meðgöngutími músarinnar er um 25 dagar. Kynslóðabilið er því mjög stutt. Nýfæddir eru ungarnir blindir og hárlausir og vege 1-2 g. Séu lífsskilyrði hagstæð getur kvenkyns músin frjóvgast meðan ungarnir eru enn á spena og fætt u.þ.b. viku eftir að þeir hætta á spena, sem styttr kynslóðabilið (Karl Skírnisson 1993). Hagamús útbúa sér hreiður í holum sem þær ýmist grafa sjálfar, erfa frá öðrum hagamúsum eða þá að holurnar eru í náttúrulegum glufum landsins.

Fæða hagamúsa er breytileg eftir svæðum og framboði og má því segja að hagamús séu tækifærissinnar í fæðuvali (Karl Skírnisson 1993).

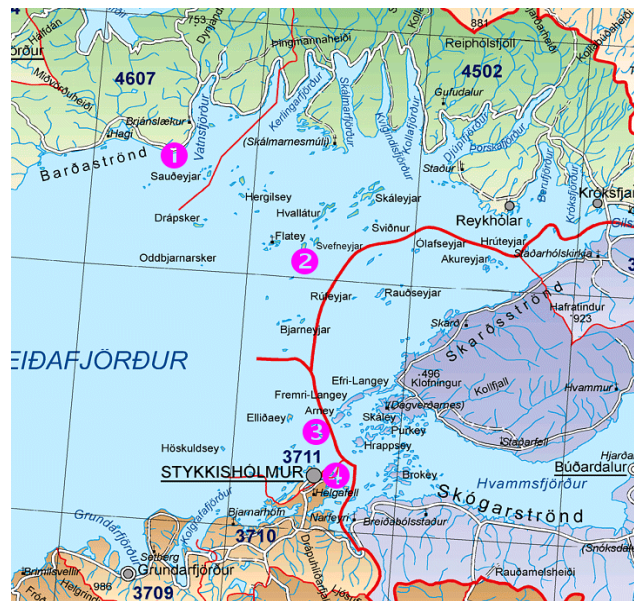
## 4 Rannsókn

### 4.1 Markmið

Ætlunin með þessari rannsókn var að kanna hvort hagamúsastofnar tveggja eyja á Breiðafirði væru erfðafræðilega frábrugðnir stofnum á meginlandinu sitt hvorum megin Breiðafjarðar og fá fyrstu hugmyndir um samskipti hagamúsastofna á því svæði. Þetta átti að gera með því að bera saman músastofna á norðanverðum Breiðafirði (Svefneyjar), sunnanverðum

Breiðafirði (Arney) og báðum megin Breiðafjarðar (Brjánslækur og Þingvellir við Stykkishólm). Skoða átti örtunglasvæði í erfðamengi músanna og bera þau saman.

Hugsanlegt er að músastofnar eyjanna séu erfðafræðilega ólíkir meginlandsstofnum vegna landnemaáhrifa. Einnig gætu þeir verið einsleitari en



2. mynd: Kort af stöðunum fjórum: Arnórstaðir(1), Svefneyjar(2), Arney(3) og Þingvellir(4) (Landmælingar Íslands).

meginlandsstofnar ef þeir eru aðeins komnir af einni eða fáum ættmæðrum sem námu þar land.

Búast má við aðgreiningu stofna þar sem genaflæði er lítið. Það má því búast við meiri aðgreiningu hjá stofnum sem búa á mjög einangruðu svæði eins og t.d í Svefneyjum. Í Arney má búast við því að stofninn sé frekar líkur meginlandsstofninum vegna nálægðar við land. Aðeins 1,5 km eru frá landi og er þessi fjarlægð að miklu leyti brúuð með skerjum. Því má gera ráð fyrir að genaflæði sé til staðar milli Arneyjar og meginlandsins.

## 4.2 Aðferðir

Verkefnið var unnið í samstarfi Náttúrustofu Vesturlands (NSV), Tilraunastöðvar H.Í. á Keldum og líffræðiskorar H.Í. Styrkur fékkst í verkefnið úr sjóðnum “Þekking stúdenta í þágu þjóðar” auk þess sem NSV bar hluta kostnaðar. Rannsóknin fór að hluta fram á NSV og að hluta á Keldum.

### 4.2.1 Sýnataka

Sýnataka fór fram haustið 2002 af Margréti Stefánsdóttur (2003) og var hluti af öðru rannsóknarverkefni. Tekin voru sýni á 4 svæðum, Arney á Breiðafirði (1,5 km<sup>2</sup>), Svefneyjum á Breiðafirði (0,4 km<sup>2</sup>), Þingvöllum í Helgafellssveit og Arnórsstöðum við Brjánslæk. Veitt var á Þingvöllum 22.-25. ágúst, á Brjánslæk 26.-29. ágúst, í Svefneyjum 3.- 6. september og í Arney 6.- 9. september.

Notuð voru 20 af 118 sýnum frá Svefneyjum, 12

frá Arney, 21 frá Arnórsstöðum og 14 frá Þingvöllum. Sýnataka fór fram með

leðurgatara sem gataði smá bít úr eyra músanna. Leðurgatarinn var hreinsaður

gaumgæfilega á milli sýnataka með vatni, ethanóli og dauðhreinsaðri blautpurru. Sýnin



3. mynd: Hagamús eyrnamerkt  
(ljósmynd: Menja von Schmalensee)



frá Arnórsstöðum og Þingvöllum fóru beint í frysti en sýnin frá eyjunum fóru ekki í frysti fyrr en komið var í land.

#### **4.2.2 DNA einangrun**

Rannsóknin hófst á því að DNA var einangrað úr sýnunum með því að nota GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amerham Pharmacia Biotech Inc). Eftirfarandi aðferð var notuð:

##### Frumurof:

1. Setti 600 µl af Cell Lysis Solution (Tris [hydroximethyl] Aminomethane ethylenediamineteracetic acid og sodium dodecyl sulfate) í 1,5 ml eppendorf glös. Kældi á ís.
2. Bætti frosnum dýravef í kældu lausnina (< 10 mg)
3. Bætti 3 µl af Próteínasa K lausn (20 mg/ml) og melti yfir nótt við 37°C.

##### Rnasa meðhöndlun.

4. Bætti 3 µl af Rnasa A (4 mg/ml) solution út í glösin.
5. Blandað vel saman og melt við 37°C í 60 mín.

##### Prótein útfelling:

6. Kældi glösin niður í herbergishita.
7. Bætti 200 µl af Protein Precipitation Solution (Ammonium acetate) út í lausnina.
8. Hristi á miklum hraða í 20 sek.
9. Spann niður við 14.000 rpm (revolutions per minute) í 3 mín.

##### DNA útfelling:

10. Hellti flötinu með DNA-inu í ný 1,5 ml eppendorf glös.
11. Setti 600 µl af 100% isopropanoli út í.
12. Blandaði saman þar til hvítir DNA þræðir mynduðust.
13. Spann niður við 14.000 rpm í eina mínútu.
14. Hellti flötinu af og bætti 600 µl af 70% ethanolu til að þvo DNA botnfallið.
15. Spann niður við 14.000 rpm í eina mínútu og hellti ethanolinu af.

#### DNA vötnun:

16. Bætti 100  $\mu$ l af DNA Hydration Solution (Tris[hydroximethyl] Aminomethane og ethylenediamineteraacetic acid) í glösin og DNA-inu leyft að vatnast í herbergishita yfir nótt.
17. Styrkurinn á DNA-inu var mældur með GeneQuant pro tæki frá Pharmacia. Styrkurinn reyndist nokkuð mismunandi og lá á bilinu 0,040  $\mu$ g/ $\mu$ l til 100  $\mu$ g/ $\mu$ l.

#### **4.2.3 Rafdráttur**

Eftir einangrunina voru sýnin rafdreigin á geli til að skoða hvort einangrunin hefði heppnast. Rafdrátturinn var gerður á eftirfarandi hátt:

Útbúið var 0,7 % agarósa gel með því að veiga 0,7 g af agarósa og leysa það upp, með hitun, í 100 ml af 1x TBE buffer (þynnt úr 10x lausn sem inniheldur 0,89M Tris, 0,89M Boric acid og 0,02M EDTA, pH 8,0). Þegar lausnin var orðin tær var hún kæld niður í 50°C og tveim dropum af ethydíum brómíði (10 mg/ml) bætt út í. Því næst var gelið sett í mót og leyft að storkna með holugreiðu í um 1 klst.

Þegar hlaðið var á gelið fór 8  $\mu$ l af sýni og 2  $\mu$ l af hleðsludúa í hverja holu. Þetta var svo dregið við 70 volt. Teknar voru myndir af gelinu með EDAS CCD kerfi frá Kodak þegar það hafði rafregist í um 2 klst. Með nokkrum undantekningum tókst þetta mjög vel.

#### **4.2.4 DNA fjölföldun (PCR)**

PCR var notað til að magna upp fjögur örtungla genasæti (1. tafla). Genasætin voru As7 (114bp), As12 (249bp), As20 (144bp) og As34 (150bp) (Harr B o.fl. 2000). Hver vísir var merktur með 6-FAM flúrljómandi lit á 5' enda. PCR var gert í 10  $\mu$ l rúmmáli.

Mjög erfitt var að fá þessa aðferð til að virka. Ég reyndi hina ýmsu styrki af hvarfefnunum í blöndunni. Ég vann út frá grein eftir Harr (2000) og var styrkurinn í hvarfefnablöndunni hjá þeim eftirfarandi: 10-100 ng af DNA, 0,2 mM dNTP, 0,5  $\mu$ M af hverjum vísi (forward og reverse), 1X PCR buffer sem innihélt 50mM KCl, 1,1mM MgCl<sub>2</sub>, og 10mM Tris-HCl og svo að lokum var notaður 0,25 einingar af DNA polymerasa.

Genasæti	Stærð	Endurt. í klóni	Vísaröð (5'-3')
As-7	114	(GT)19	F: CAGGTCTTATTCTTCCAGTTA
AF246520			R: ACAATTGATTAATTTGGAACC
As-12	249	(TG)22 (GA)24	F: TGTCAGGTCTCAACAGTAGG
AF246522			R: CTGTTTGGAGTTGTTGTTCTG
As-20	144	(GT)25	F: CAGGTGAACACCCTCCCATAA
AF246523			R: AGCCACAGAGCCAATAAGAAG
As-34	150	(AC)18	F: CCAGAAGTATGCTGTGGTTTT
AF246526			R: TTAAGAATGACTAAGGATCAG

**1. tafla:** Örtungla genasæti í hagamúsum

Ég prófaði mig áfram í mismunandi styrkjum aðra hvora viku frá janúar-apríl, þá var tíminn sem ég hafði á þrotum. Sú uppskrift sem kom best út var eftirfarandi:

Hvarfefnisblanda (heildarrúmmál 10 µl):

PCR buffer: 1,0µl

dNTP mix: 0,2 µl

Flúrmerktur vísir: 0,5 µl af (fram og aftur vísir) 10mM styrk

AmpliTaqGold polymerasi: 0,05 µl (einingar/µl)

MgCl<sub>2</sub>: 0,8 µl

DNA sýni: 1,0 µl

Vatn: 6 µl

PCR hvarfið fór svo fram á eftirfarandi hátt:

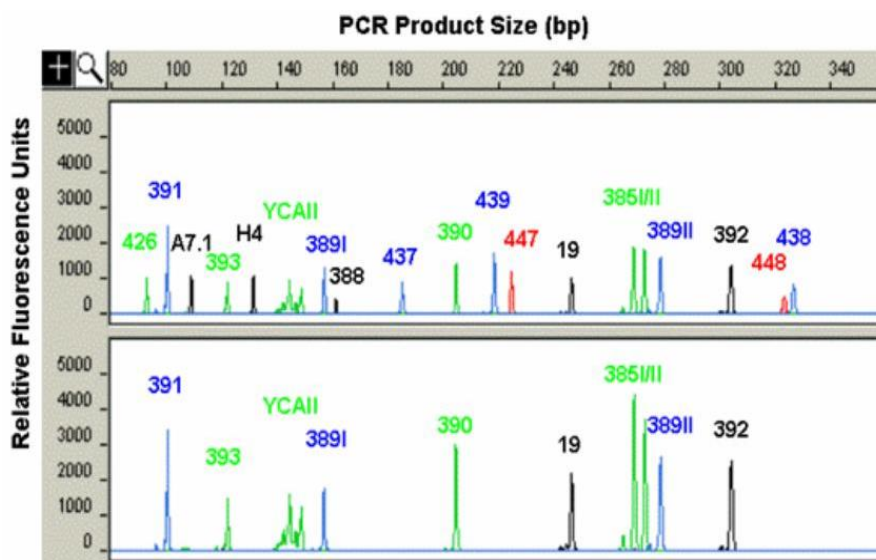
1. 95°C í 10 mín til að virkja polymerasan
2. 95°C í 30 sek
3. bindi hitastig í 30 sek. Fyrir As7=47,8°C, As12=53,6°C, As20=55,0 og As34=47,1°C
4. 72°C í 60 sek  
2-4 er endurtekið 30x
5. 72°C í 10 mín
6. 4°C eins lengi og þarf

Eftir hverja PCR keyrslu setti ég 2 µl af sýnunum í örgreiningu.

#### 4.2.5 Örgreining

Örgreiningin fór fram í ABI PRISM 310 Genetic analyser. ABI 310 tækið er með 10 mW argon laser sem gefur frá sér öflugt ljós með bylgjulengdirnar 488 og 514 nm. DNA-ið er rafdreigið í mjórri pípu (capillary) í stað hefðbundins steypst gels. Þegar DNA-ið ferðast framhjá ljósgeislanum sem laserinn gefur frá sér örvast fluorophore eindir í litnum sem búið er að merkja DNA-ið með (með því að vera með flúorljómandi prímera í PCR hvarfinu) og gefa frá sér ljós sem CCD myndavél í tækinu skynjar en hún nemur ljós á bilinu 525-650 nm. Þannig nemur tækið hvernig DNA bútarnir fara um pípunna. 6-FAM liturinn, sem notaður var, örvast við 494 nm og við það gefur hann frá sér ljós á bylgjulengdinni 517 nm en þessi litur hefur verið þróaður sérstaklega til að nota með ABI PRISM™ Genetic Analysis Systems raðgreiningartækjum. Með því að keyra stærðarviðmiðanir með sýnunum reiknar forrit sem fylgir tölvunni út stærðina á bótunum.

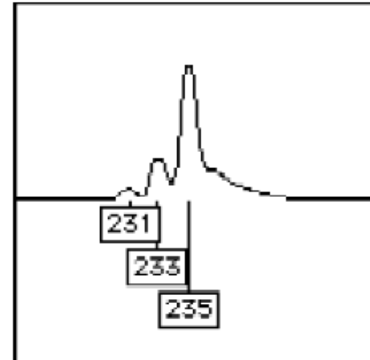
Notað var Genescan-350™ Rox sett sem stærðarviðmið en það inniheldur stærðarbönd með 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340 og 350 bösum. Búin var til blanda í eftirfarandi hlutföllum: 0,5 µl af stærðarviðmiði, 2,5 µl formamíð, 0,25 µl hleðsludúi og 6,75 µl eimað vatn. Þetta dugði fyrir eitt sýni. 13 µl af þessari blöndu var sett í örgreiningarglas ásamt 2 µl af PCR afurð.



4. mynd: Dæmi um niðurstöður úr örgreiningartæki þar sem notaðir hafa verið fjórir mismunandi flúorljómandi litir til að merkja bótana ([http://www.contexo.info/DNA\\_Basics/microsatellite\\_analysis.htm](http://www.contexo.info/DNA_Basics/microsatellite_analysis.htm)).

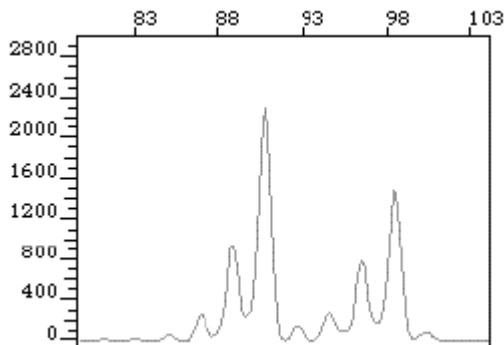
Hvert sýni var keyrt í 30 mín. Ekki fengust miklar niðurstöður úr þessu vegna misheppnaðs PCR. Í lokin mátti þó greina einhverja toppa en ekki gafst tími til að prófa sig áfram eftir það.

Á 4. mynd má sjá dæmigerðar niðurstöður úr örgreiningu. Staðsetning toppanna á x-ásnum gefur til kynna fjölda basapara í bútnum. Til að vita hvort um raunverulegan topp sé að ræða þarf að skoða hvern topp fyrir sig. Þegar skoðaðar eru tvíendurteknaðar raðir á toppurinn að fara lækkandi um 2 bp, svo 4bp, svo 6bp o.s.frv. til vinstri (5. mynd).

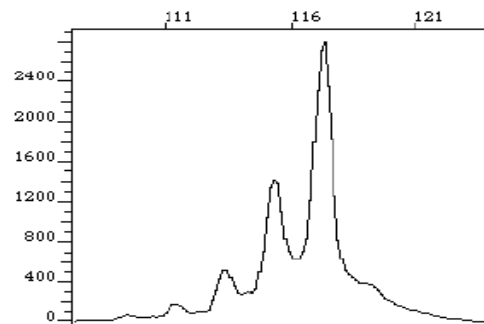


5 mynd: tvíkrinis toppur  
(Gene Scan reference guide 2000)

Þegar einn toppur myndast er um að ræða arfhreinan einstakling um þessa endurtekningu, en ef tveir toppar myndast er um að ræða arfblendinn einstakling, sjá myndir 6 og 7 um dæmigerða arfblendna og arfhreina toppa.



6. mynd: Dæmigert mynstur fyrir arfblendnar endurtekningar  
(Gene Scan reference guide 2000)



7. mynd: Dæmigert mynstur fyrir arfhreinar endurtekningar  
(Gene Scan reference guide 2000)

### 4.3 Niðurstöður

Eins og áður sagði þá fengust engar haldbærar niðurstöður úr þessu verkefni. Það var PCR hvarfið sem ekki gekk upp hjá mér. Ég reyndi hinar ýmsu hvarfefnablöndur og sú sem reyndist best sýndi einhverja toppa en ekki nógu góða, þ.e þeir litu ekki út eins og dæmigerðir toppar eiga að líta út (sjá kafla 4.2).

## **5 Lokaorð**

Eins og komið hefur fram felst þróun í breytingum á erfðæfninu frá kynslóð til kynslóðar. Þróun ræðst af náttúrulegu vali, stökkbreytingum, genaflæði og hendingu. Þessir þættir geta valdið því að stofnar aðgreinast hver frá öðrum vegna mismunar í erfðasamsetningu.

Eitt einkenni eyjastofna er að þeir hafa minni fjölbreytileika í genamengi sínu en meginlandsstofnar. Örtungl gefa möguleika á að skoða þennan fjölbreytileika á tiltölulega þægilegan og hagstæðan máta.

Eyjastofnar eru einstaklega áhugaverðir því að þeir eru gott líkan fyrir hina ýmsu þætti sem skoða á. Oft er mjög flókið samspil milli þeirra þátta sem hafa áhrif á þróun. Hjá eyjastofnum er auðveldara að útiloka þætti sem skipta litlu máli, en það er einmitt það sem gott líkan þarf að geta gert.

Hagamúsastofnar á Breiðafirði er mjög áhugavert rannsóknarefni því ekki er mikið vitað um hvernig samskiptum þessara stofna er háttað. Hagamúsinn er líka, eins og áður sagði, mjög hentug til að skoða þá þætti sem þessi rannsókn beindist að.

Því miður lenti ég í ýmsum tæknilegum vandamálum auk þess sem PCR hvarfið fór margsinnis úrskaiðis. Af þeim sökum reyndist ekki nægur tími til að prófa mismunandi styrki hvarfefna í PCR hvarfefnablöndunni. Þegar lokið verður við að besta PCR hvarfið, ætti eftirleikurinn að verða tiltölulega einfaldur, en það mun koma í hlut einhvers annars.

## 6 Heimildaskrá

1. Armour JAL, Alegre SA, Miles S, Williams LJ, Badge RM (1999) Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. Í: Goldstein DB, Schlötterer C, *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford.
2. Baker AJ (2000) *Molecular methods in ecology*. Blackwell Science Ltd, London.
3. Balloux F, Lugon-Moulin N (2002) The estimation of popular differentiation with microsatellite markers. *Molecular ecology*, **11**, 155-165.
4. Beaumont MA, Bruford MW (1999) Microsatellites in conservation genetics. Í: Goldstein DB & Schlötterer C (ritstj.) *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University press, Oxford.
5. Beckmann JS, Weber JL (1992) Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, **12**,627-631.
6. Birt TP, Baker AJ (2000) Polymerase chain reaction. Í: Baker AJ (ritstj.) *Molecular methods in ecology*. Blackwell Science Ltd, Oxford.
7. Chambers GK, MacAvoy ES (2000) Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative biochemistry and physiology part B*, **126**,455-476.
8. Ciofi C, Bruford MW (1999) Genetic structure and gene flow among Komodo dragon population inferred by microsatellite loci analysis. *Molecular Ecology*, **8**,17-30.
9. Cöte SD, Dallas JF, Marshall F, Irvine RJ, Langvatn R, Albon SD (2002) Microsatellite DNA evidence for genetic drift and philopatri in Svalbard reindeer. *Molecular Ecology*, **11**,1923-1930.
10. Dallas JF (1992) Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome*, **3**,452-456.
11. Degerböl M (1939) The field mouse of Iceland, its systematic position (*Apodemus sylvaticus grandiculus* subsp. nov.) and biology. Í: Bjarni Sæmundsson (ritstj.) *The zoology of Iceland iv*, **76**,39-52.
12. Foltz DW, Hoogland JL (1983) Genetic-evidence of outbreeding in the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). *Evolution*, **37**,273-281.
13. Frankham R (1997) Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* **78**,311-327.

14. Futuyma DJ (1997) *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Massachusetts.
15. Gaines MS, Diffendorfer JE, Tamarin RH, Whittam TS (1997) The effects of habitat fragmentation on the genetic structure of small mammal populations. *Journal of heredity*, **88**,294-304.
16. Gene Scan reference guide. Abi prism 310 genetic analyses (2000). Applied Biosystem.
17. Goldstein DB, Pollock DD (1997) Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of heredity*, **88**,335-342.
18. Goldstein DB, Sclötterer C (1999) *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University press, Oxford.
19. Hancock JM (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomoc context and mutational mechanism. Í: Goldstein DB & Sclötterer C (ritstj.) *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University press, Oxford.
20. Harr B, Musolf K, Gerlach G (2000). Characterization and isolation of DNA microsatellite primers in wood mice (*Apodemus sylvaticus*, Rodentia). *Molecular ecology*, **9**,1664-1665.
21. Hartl DL (1981) *A primer of population genetics*. Sinauer Associates, Massachusset.
22. Hartl DL, Clark AG (1989) *Prinsiples of population genetics*, 3 útg. Sinauer Associates, Massachusset.
23. Hedrick PW (1985) *Genetics of population*. Jones and Bartlett Publisher, Boston.
24. Hedrick PW, Gutierrez-espeleta GA, Lee RN (2001) Founder effect in an island population of bighorn sheep. *Molecular ecology*, **10**,851-857.
25. Hochberg ME, Möller AP (2001) Insularity and adaptation in coupled victim-enemy associations. *Journal of evolutionary biology*, **14**,539-551.
26. Karl Skírniirsson. (1993) Nagdýr á Íslandi. Í: Páll Hersteinsson og Guttormur Sigbjarnarson (ritstj.): *Villt íslensk spendýr*. Hið íslenska náttúrufræðifélag – Landvernd. Reykjavík. Bls. 330-334.
27. Kimura M (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* **217**,624-626.
28. Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **4**,203-221.



29. Margrét Stefánsdóttir (2003) Stofnvistfræði hagamúsa (*Apodemus sylvaticus*) í Breiðafirði. 6 eininga námsritgerð við líffræðiskor Háskóla Íslands.
30. Maruyama T, Fuerst PA (1985) Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics*, **7**,811-813.
31. Nei M (1975) *Molecular Population Genetics and Evolution*. American Elsevier, New York.
32. Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in population. *Evolution* **7**,1-10.
33. Nei M, Tajima F (1981) DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, **97**,146-163.
34. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**,1350-1354.
35. Schlotterer C, Trautz D (1992) Slippage syntethesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res*, **20**,211-215
36. Schlötterer C (1998) Microsatellites. Í: Hoelzel AR, *Molecular Genetics Analysis of Population: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.
37. Sing RS, Rhomberg LR (1987) A comprehensive study of gene variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. I. Estimates of gene flow from rare alleles. *Genetics*, **115**,646-322.
38. Soulé ME (1973) The epistasis cycle: a theory of marginal population. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **4**,165-187.
39. Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Tree*, **15**,199-203.
40. Suzuki DT, Griffiths AJF, Miller JH, Lewontin RC (1989) *An Introduction to Genetic Analysis*. W.H. Freeman, New York.
41. Tarr CL, Conant S, Fleisher RC (1998) Founder events and variation at microsatellite loci in an insular passerine bird, the Laysan finch (*Telespiza cantans*). *Moleculer ecology* **7**,719-731.

42. Tettelin G, Radune D, Kasif S, Khouri H, Salzberg SL (1999) Optimized multiplex PCR: efficiently closing a whole genome shotgun sequencing project. *Genomics*, **62**,500-507.
43. Whittaker RJ (1998) *Island Biogeography. Ecology, Evolution and conservation*. Oxford University Press. U.K.
44. Wright S (1931) Evolution in Menelian population. *Genetics*, **7**,97-159.
45. Wright S (1951) The genetical structure of population. *Annals of Eugenics*, **7**,323-354.
46. Yu HT, Peng YH (2002) Population differentiation and gene flow revealed by microsatellite DNA markers in the house mouse in Taiwan. *Zoological science*, **19**,475-483.
47. Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, **11**,1-16.